

橘小实蝇 nAChR $\alpha 9$ 亚基基因的鉴定及其时空表达

袁国瑞¹, 杨文佳^{1,2}, 许抗抗^{1,2}, 王进军^{1,*}

(1. 西南大学植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室, 重庆 400716;

2. 贵阳学院生物与环境工程学院, 贵阳 550005)

摘要:【目的】橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 是世界性分布的危害果蔬的重要检疫性农业害虫, 目前已对包括新烟碱类在内的多种杀虫剂产生了抗性。本研究在克隆鉴定橘小实蝇烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR) $\alpha 9$ 亚基基因 cDNA 的基础上, 对其分子特性和系统发育进行生物信息学分析, 并检测了该基因在橘小实蝇不同发育阶段及成虫不同组织中的表达模式, 为进一步研究其潜在功能及在抗药性中的作用奠定基础。【方法】通过高通量测序技术对橘小实蝇进行转录组测序, 对高质量序列拼接组装、基因鉴定及同源性比对分析, 预测橘小实蝇烟碱型乙酰胆碱受体候选基因。采用 RT-PCR 和 RACE(rapid-amplification of cDNA ends)技术克隆该基因的 cDNA 全长序列, 利用生物信息学分析软件分析其基本生物信息; 以 α -tubulin 为内参基因, 利用 qPCR 研究该基因 mRNA 在橘小实蝇不同发育阶段及成虫头、胸、腹等组织中的表达模式。【结果】根据预测的基因序列, 设计特异性引物进行 RACE 扩增, 从橘小实蝇中克隆获得一条烟碱型乙酰胆碱受体基因的全长序列, cDNA 全长 1 486 bp, 完整开放阅读框 1 281 bp, 编码 426 个氨基酸, 推测其蛋白质分子量为 49.1 kD, 理论等电点 6.56。该基因经序列比对命名为 *Bda $\alpha 9$* , GenBank 登录号为 JQ178254。氨基酸同源性及系统进化树分析显示, 该基因的编码蛋白具有 nAChR α 亚基的典型特征, 并与 *Ag $\alpha 9$* 和 *Dm $\beta 3$* 聚类在一起, 与其他昆虫 nAChR $\alpha 9$ 亚基具有 22% ~ 27% 的氨基酸序列一致性。qPCR 结果表明, *Bda $\alpha 9$* mRNA 在橘小实蝇整个发育阶段均有表达, 成虫期的表达量显著高于卵、2 龄幼虫、3 龄幼虫和蛹期; *Bda $\alpha 9$* 在橘小实蝇成虫头部中表达量最高, 且显著高于胸部和腹部中的表达量。【结论】鉴定了橘小实蝇烟碱型乙酰胆碱受体基因 *Bda $\alpha 9$* , 明确了该基因在橘小实蝇不同发育阶段及成虫不同组织中的表达模式。根据 qPCR 的结果, 推测 *Bda $\alpha 9$* 可能在橘小实蝇成虫期具有重要功能。

关键词: 橘小实蝇; 烟碱型乙酰胆碱受体; 基因克隆; 序列分析; 表达谱; 实时定量 PCR

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)11-1189-10

Identification and expression profiling of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$ subunit gene in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)

YUAN Guo-Rui¹, YANG Wen-Jia^{1,2}, XU Kang-Kang^{1,2}, WANG Jin-Jun^{1,*} (1. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. College of Biology and Environment Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China)

Abstract: 【Aim】The oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, is an important worldwide quarantine pest that damages many fruits and vegetables and has developed resistance to many insecticide classes including

基金项目: 中国博士后基金(2013M540693); 重庆市前沿与基础研究项目(cstc2013jcyjA80020); 重庆市博士后特别资助项目(Xm2014114); 公益性行业(农业)科研专项(201203038)

作者简介: 袁国瑞, 男, 1979 年 1 月生, 河南新乡人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫毒理与抗药性, E-mail: ygr@swu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jjwang7008@yahoo.com

收稿日期 Received: 2016-08-04; 接受日期 Accepted: 2016-09-19

neonicotinoids. In this study, based on the identification of the cDNA of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$ subunit gene in *B. dorsalis*, we analyzed its molecular characterization and polygenetic relationship, and detected its expression pattern in different developmental stages and adult tissues of *B. dorsalis*, which will lay the foundation for further understanding the potential function properties and the role of *Bd $\alpha 9$* in insecticide resistance in *B. dorsalis*. 【Methods】Based on the transcriptome data of *B. dorsalis* by next-generation sequencing, nicotinic acetylcholine receptor gene sequence was successfully screened, assembled and identified by homologous blast. The full-length cDNA sequence was cloned by using RT-PCR and RACE technology, and bioinformatics analysis software package was used to predict its general biological information. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to investigate the expression profiles of this gene in different developmental stages of the fly and the head, thorax and abdomen of adult *B. dorsalis*. 【Results】The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 9$ subunit gene was cloned from *B. dorsalis* by specific primers designed based on the predicted gene sequence. The full-length cDNA contains 1 486 bp with 1 281 bp of open reading frame encoding 426 amino acids with a predicted molecular weight of 49.1 kD and an isoelectric point of 6.56. The gene was named *Bd $\alpha 9$* with the GenBank accession number of JQ178254. The amino acid sequence homology and phylogenetic tree analysis indicated that *Bd $\alpha 9$* possesses the typical characteristics of nAChR α subunit, clusters together with *Ag $\alpha 9$* and *Dm $\beta 3$* , and shares 22% – 27% amino acid sequence identity with nAChR $\alpha 9$ subunits from other insects. The qPCR results showed that *Bd $\alpha 9$* was expressed in all developmental stages of *B. dorsalis*. The relative expression level of *Bd $\alpha 9$* in the adult was significantly higher than those in the egg, the 2nd instar larva, the 3rd instar larva and the pupa. The expression level of *Bd $\alpha 9$* in adult head was the highest and significantly higher than those in adult thorax and abdomen. 【Conclusion】The nicotinic acetylcholine receptor gene, *Bd $\alpha 9$* , was identified, and its expression profiles in different developmental stages and adult tissues of *B. dorsalis* were examined, with the highest expression level in adults and the adult head, respectively, implying that it may play a critical role in the central nervous system of adult.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; nicotinic acetylcholine receptor; gene cloning; sequence analysis; expression profile; qPCR

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 是一种世界性分布的危害果蔬的实蝇科 (Tephritidae) 重要农业害虫, 已被多个国家列为检疫对象。橘小实蝇可危害 46 科 250 多种水果和蔬菜。成虫可刺穿果皮产卵, 卵在果肉中孵化主要通过幼虫取食为害, 大大降低了果品的市场价值, 给农业生产带来巨大的经济损失 (Follett and Neven, 2006; Hsu *et al.*, 2015)。橘小实蝇的防控一直以化学防治为主, 主要杀虫剂包括有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类等传统杀虫剂。由于化学农药的不合理使用, 导致田间橘小实蝇对多种杀虫剂产生了不同程度的抗性 (章玉苹等, 2007; Jin *et al.*, 2011)。随着新型及生物源农药的商品化, 这些药剂逐渐用于橘小实蝇的田间防控, 如大环内酯类杀虫剂 (多杀菌素)、新烟碱类杀虫剂 (吡虫啉) 等。因此, 对这两类杀虫剂的作用靶标——烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 进行研究, 对于探明橘小实蝇对这

两类杀虫剂的抗性机制并制定科学防控橘小实蝇的方案具有重要的指导意义。

nAChR 是昆虫中枢神经系统中介导胆碱能突触传递的重要神经递质门控离子通道 (Matsuda *et al.*, 2001), 属半胱氨酸环类配基门控离子通道 (Cys-loop ligand-gated ion channel, LGIC) 超家族成员。昆虫 nAChR 由 5 个亚基组成, 每个亚基包含一个胞外配基结合域及由 4 个跨膜区构成的离子孔洞结构域, 构成 ACh 结合腔的重要氨基酸残基形成的 6 个环 (Loop A – F) 中, 根据 Loop C 上有无两个相邻的半胱氨酸分为 α 、非 α (β) 亚基 (Lester *et al.*, 2004; Grutter *et al.*, 2005)。

目前, 随着高通量测序技术的发展, 已鉴定的昆虫 nAChRs 亚基的数量不断增加, 如: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中鉴定出 10 个 (Jones *et al.*, 2005); 西方蜜蜂 *Apis mellifera* 11 个 (Jones *et al.*, 2006); 家蚕 *Bombyx mori*、赤拟谷盗 *Tribolium*

castaneum (Jones and Sattelle, 2007; Shao *et al.*, 2007) 和苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (Martin and Garczynski, 2016) 中各 12 个; 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 中 16 个 (Jones *et al.*, 2010)。对昆虫 nAChR 的研究报道集中在不同亚基在抗药性形成中的作用。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* nAChR N1 α 1 和 N1 α 3 亚基 Y151S 突变导致其对吡虫啉的靶标抗性, 与其他新烟碱类药剂也产生了交互抗性 (Liu *et al.*, 2005, 2006)。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、橘小实蝇和西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* nAChR $\alpha 6$ 亚基的敲除、截短及氨基酸取代分别参与其对多杀菌素的抗性形成 (Perry *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2010; Rinkevich *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2012; Puinean *et al.*, 2013)。另有研究报道家蝇 *Musca domestica* nAChR Md α 5 与 Md β 3 及西花蓟马 nAChR $\alpha 6$ 未参与其对多杀菌素的抗性 (Gao *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2014)。此外, 桃蚜 *Myzus persicae* 和棉蚜 *Aphis gossypii* nAChR $\beta 1$ 亚基 R81T 突变与其对吡虫啉的抗性相关 (Bass *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012)。这些研究表明, nAChR 亚基的多样性在不同昆虫对药剂的抗性中的作用存在差异。有关 nAChR 在橘小实蝇中的研究仅限于 $\alpha 6$ 和 $\beta 3$ 亚基, 仍未见对该受体其他亚基的相关报道。

本研究以转录组测序获得的 nAChR 的序列为基础, 应用 RACE 技术获得其全长 cDNA 序列, 经分析鉴定为 nAChR $\alpha 9$ 亚基, 利用 qPCR 技术检测了 *Bda9* 在橘小实蝇不同发育阶段和成虫不同体段的表达模式, 为深入研究 nAChR 在橘小实蝇抗药性形成中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试橘小实蝇于 2007 年采自福建省福州市, 在实验室人工气候箱内以人工饲料饲养, 饲养条件为温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 、光周期 14L: 10D。成虫置于 $30\text{ cm} \times 30\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ 的笼中饲养, 液体饲料主要成分为酵母粉 (40 g)、白糖 (60 g), 加 1 L 水煮沸, 待温度降至 50°C 左右加入蜂蜜 (16 mL) 和维生素 C (1 g), 混匀。成虫交配后在笼内放入盛有固体饲料的培养皿诱集产卵, 固体饲料的主要成分为琼脂 (18 g)、玉米粉 (180 g)、麦胚粉 (75 g)、酵母粉 (60 g)、白糖 (60 g) 和滤纸 (3 张), 加适量水煮至

粘稠, 待温度降至 50°C 左右时加入山梨酸 (2.1 g)、尼泊金甲酯 (4.2 g)、亚油酸 (1 mL) 和维生素 C (3 g)。孵化后的幼虫在培养皿中以固体饲料饲养, 待发育至 3 龄后让其跳入沙盘中化蛹。每隔一定时间将蛹筛出置于带土的封口塑料杯内, 待其羽化后再放入养虫笼中饲养。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂 (Trizol Reagent, 北京博迈德公司); DNA 胶回收试剂盒 (Gel Extraction Mini Kit, 上海华舜生物工程有限公司); RACE 试剂盒 (SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech); 反转录试剂盒 (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa); DNase 和 Taq 酶 (TaKaRa); 载体 (pGEM-T Easy, Promega); 感受态细胞 T1 (北京全式金生物技术有限公司); 实时定量 PCR 试剂 (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega)。

1.3 总 RNA 的提取及第一链 cDNA 合成

按照 Trizol 试剂盒说明书, 分别选取卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、蛹、成虫及成虫头、胸、腹部于盛有液氮的研钵中快速充分研磨至干粉状, 随后加入 2.5 mL Trizol 试剂继续研磨。取 1 mL 研磨液转入 DEPC 处理的 1.5 mL 离心管中, 按试剂盒说明书进行后续操作。对提取的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测其完整性。选取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值在 1.8 ~ 2.2 的 RNA 样品保存于 -80°C 冰箱备用。

提取的总 RNA 用 DNase 去除基因组 DNA 后, 分别按 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书合成相关第一链 cDNA, 于 -20°C 保存备用。

1.4 引物设计与合成

根据本实验室测得的橘小实蝇转录组数据库中有关 nAChR 基因片段信息, 设计特异性引物 (Bd-F 和 Bd-R) 进行 PCR 扩增, 获得橘小实蝇 nAChR cDNA 片段。根据所获得的 cDNA 序列设计巢式引物 (表 1) 与试剂盒提供的接头引物分别进行 3' 端和 5' 端扩增。将 3' 及 5' 端扩增结果与已有片段进行拼接, 并据此设计全长验证引物 (Bd-full-F 和 Bd-full-R) 用于橘小实蝇 *Bda9* 基因开放阅读框的扩增, 引物合成由上海英俊生物技术有限公司完成。

1.5 基因克隆

以 1.3 节中合成的 cDNA 为模板, 利用特异性引物 Bd-F、Bd-R 扩增 *Bda9* 基因片段。25 μL PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL 、10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL 、

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	用途 Purpose
Bd-F	ACTACAGAATCAAAATTTTACT	<i>Bdα9</i> cDNA 片段扩增 Amplification of <i>Bdα9</i> cDNA fragment
Bd-R	GTCACCTTATATTTCATACTCG	
Bd-Race-R1	CCATCATAAGTCCACGAACCGAGA	5' RACE
Bd-Race-R2	CGCCAAAGCACATTCAAAAGTCCC	
Bd-Race-F1	GGGTGCCAGACTTAGAGGTTTA	3' RACE
Bd-Race-F2	GGCACCGTCATATTGGCACACA	
Bd-full-F	GCACTATGAAGTGCTGAAATT	<i>Bdα9</i> ORF 扩增 Amplification of <i>Bdα9</i> cDNA ORF
Bd-full-R	TGGTTAAACGAAACAAACAGT	
qBd-F1	TGCGCCCGATAAGTTTCTAC	<i>Bdα9</i> 实时定量 PCR Quantitative real-time PCR of <i>Bdα9</i>
qBd-R1	GCTGTCATTGGGTTTCGTAT	
qBd-F2	CGCATTCATGGTTGATAACG	参比基因 <i>α-tubulin</i> 实时定量 PCR Quantitative real-time PCR of the reference gene <i>α-tubulin</i>
qBd-R2	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	

MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL、dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL、Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL、上下游引物(20 μmol/L) 各 1 μL,然后 ddH₂O 补足 25 μL。PCR 扩增条件:94℃预变性 3 min;然后 94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 34 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

以 1.3 节中合成的 RACE cDNA 为模板,利用特异性引物(表 1)与试剂盒提供的接头通用引物(UPM、NUP)进行 3'和 5'端的巢式 PCR 扩增,反应体系与片段扩增体系相同。PCR 反应条件:94℃预变性 3 min;然后 94℃变性 30 s,55~58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。回收的扩增片段及 RACE 产物连接到 pGEM-T Easy 载体(按照说明书操作),再转化到感受态大肠杆菌 DHT1 中。经蓝白斑筛选,随机挑取多个白色菌落扩大培养,选取 PCR 鉴定呈阳性的克隆送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析

采用 Vector NTI 11.5 软件包(Invitrogen, USA)中 ContigExpress 对测序结果进行编辑和分析,序列多重比对利用 DNAMAN 6.03 (Lynnon Biosoft, USA)。采用 ExPASy Proteomics Server (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测推导的蛋白质的理化性质。用 SignalP 4.1 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测,跨膜结构域的预测利用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。利用 MEGA 6.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining)法构建系统发育树,各分支均进行 1 000 次的重复检验。

1.7 橘小实蝇 *Bdα9* mRNA 表达模式分析

根据已发表的有关橘小实蝇内参基因稳定性评估结果(Shen *et al.*, 2010),选取 *α-tubulin* 作为 qPCR 检测的内参基因。采用实时定量 PCR 方法测定橘小实蝇 *Bdα9* 基因在不同发育阶段及成虫不同组织中的相对表达量。qPCR 所用引物的信息见表 1。qPCR 反应体系为 20 μL; cDNA 模板 1 μL、GoTaq[®] qPCR Master Mix 10 μL、ddH₂O 7 μL、10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL。PCR 扩增条件:95℃预变性 2 min;然后 95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,共循环 40 次;每组试验重复 3 次。*Bdα9* 和 *α-tubulin* 扩增效率分别为 93.6% 和 104.8%。采用 2^{-ΔΔC_t} 方法计算不同发育阶段及组织中的基因相对表达量(Pfaffl, 2001)。

1.8 数据分析

采用 SPSS 23.0 软件对基因表达水平进行差异显著性分析(*P* < 0.05)。

2 结果

2.1 橘小实蝇 *Bdα9* 的全长序列分析

基于橘小实蝇转录组数据选取 1 条烟碱型乙酰胆碱受体基因片段,通过 RT-PCR 和 RACE 扩增分别获得中间、3'及 5'端的片段序列,经序列拼接及全长 cDNA 序列验证,最终获得橘小实蝇 nAChR 亚基基因 cDNA 全长序列(图 1)。序列全长为 1 486 bp,其中 5'及 3'端非编码区分别为 69 和 136 bp,开放阅读框长度为 1 281 bp,编码 426 个氨基酸,其中 SignalP 预测的信号肽由 28 个氨基酸构成,预测的分子量为 49.1 kD,理论等电点 pI 为 6.56。

1 ACATGGGGAGTTGATTTTGAAGTGC AAACGAGTAAGTGACTTTTCCAATTGCGGCGTCTCAGCAGCACTA*GAAGTGTCTGAAATTCGCA
M K C L K F A

91 TCGTGGTCTGCGTTGAGCAGCTTTTATTTAATCTATTTTCAATTGTAATCACTACAGAATCAAATTTTACTCCGCATCTGTGGCAGGT
S W S A L S S F Y L I L F S I V I T T E S K F Y S A S V A R
↑

181 CAATCGCTCATCACTGATTTGTTCTGTAATTACAATGCATCGTTAAGCCACCGGAGGGTCAACGCATGTGATGCATACAACTTA
Q S L I T D L F V N Y N A L V K P T G E G Q R I D V H T N L

271 GTGTTAGAACATTTTGACTTTCGAGAGTCGGATGGATCAGTTTCATTGTTGGGACTTTTGAATGTGCTTTGGCAAGATCCCAAATTAGGT
V L E H F D F R E S D G S V H F V G L L N V L W Q D P K L G

361 TGGAACCCGCGCGATTACAATACTTAAGTTCGATACAGTACGTCAGTCAAAATTTGATTGGGTGCCAGACTTAGAGGTTTACAATAATGCG
W N P R D Y N N L T R I P V R Q K L I W V P D L E V Y N N A

451 CCCGATAAGTTTCTACGAATGCACCATCACGGCACCGTCATATTGGCACACACTGGCATGGTACTCTGTAGCGATAACGTTGATATGAAT
P D K F L R M H H H G T V I L A H T G M V L C S D N V D M N

541 GTTTTTTGCAGCACAAACATGAATAATTGGCCACATGATAACATGAGTGTAACATAAATCTCGTTCTGGACTTATGATGGTTTCGAA
V F C S T N M N N W P H D K H E C K L N L G S W T Y D G F E

631 TTGGACTTTAAGAATTATACGAACCCCAATGACAGCATGAGTTTGGAGGATAAATATATGGCAGTATGAAATATAAGGTGACCGATTTC
L D F K N Y T N P N D S M S F E D K Y M A S M K Y K V T D F

721 AGTGTGGAACGTGTAGCGACTGTCTACTCTGTTGTGCCGAGCCATATATCGTTATGGAGTATCATCTAAGTTTGGCGCAGCTGTGCC
S V E R V A T V Y S C C A E P Y I V M E Y H L S F E R R C A
####

811 TTTGTTACCGTATTTTCGGGCGCTGGGTTCAACGGTTATATTAAGTGTCAATGGTTACATTATGTTTGGAGCAGGTCATCTCGAAATA
F V T V F R A L G S T V I L L S M V T L C F E T S H H S K I

901 TGCTCTCAATGGTTTGAATTTGATCATATAACGTTTCGTTTGTCTATATTTTGCTCAAAATGTGGGTAAATTCGCGCTACTACACCTTAC
C L N G L N L I I I T F V L L Y F A Q N V G K F A R T T P Y

991 ATTTGTGAAATCTTCAGCTGCAGCTACATTTTGGTTACATTTCCAACAGCTCTTACCGTCTTTTCAATATTCGCCACACATGCTTCGTAT
I V K F F S C S Y I L V T F Q Q L L T V F S I F A T H A S Y

1081 CGCGGCAAACTACATCCCACTATATCTAACTTGCTCCGGCAGCTCATTTGTTTCTTATATCACACCAAGAGGAAAAATGCGCTCTGCTCAG
R G K L H P T I S N L L R H S F V S Y I T P K R K M R L A Q

1171 CCTGAAACTTGCAGCGTGAACGCTCAATTTGAGGATGTGACATTGCAGGAATTTAGTAATTTGATATCTGCCGACGAAACACCTTATGAA
P E T C D V N A Q F E D V T L Q E F S N L I S A D E T P Y E

1261 TGGATGCAGTTGGCGAGCTTTTATGAGAGTATTTGAGGATTTATATATTTAGCATCATATCTAATTTTAGCTACTGTTTGTTCGTTTAA
W M Q L A S S F M E S F A V I I F S I I Y L I L A T V C F V *

1351 CCAATGTCAATTTAGGTATTACATACATACATACATAAGTATGTATTTATCTATAAAATCAATCATTAAGTAGAGCACCTACCGTTAA
1441 ATAAAAACGTTGAAATATGATATAAAAAA

图1 橘小实蝇 *Bdα9* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *Bdα9* in *Bactrocera dorsalis*

图中垂直箭头所指为推导的信号肽分裂位点;星号分别标示起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA;下划线为 4 个跨膜结构域;下划虚线为 1 个半胱氨酸环 (Cys-loop);Loop C 中的 nAChR α 亚基特有的两个相邻的半胱氨酸以####标示;氮端糖基化位点用方框标示。The predicated signal peptide cleavage site is marked with a vertical arrow. The start codon and the stop codon are marked with an asterisk, respectively. The positions of 4 putative transmembrane domains are underlined. The Cys-loop domain is underlined with a dotted line. The cysteine doublet (characteristics of nAChR α subunits) is marked with ####. N-linked glycosylation sites are boxed.

将获得的氨基酸序列在 NCBI 中进行比对分析发现:与埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊、西方蜜蜂及家蚕 nAChR α 9 亚基氨基酸序列一致性分别为 27%、26%、23% 和 22%;与黑腹果蝇 nAChR β 3 及家蚕 β 1 亚基具有 27% 和 24% 的氨基酸序列一致性,但氨基酸多重比对表明其 Loop C 的序列明显不同,橘小实蝇该基因编码的蛋白具有 nAChR α 亚基的典型特征,即 YXCC 基序,而在黑腹果蝇 β 亚基中却不存在(图 2),故将其命名为 *Bdα9* (GenBank 登录号: JQ178254)。

橘小实蝇 *Bdα9* 具有烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基的典型特征(图 1, 图 2)。拥有一个长的氮端胞外结构域及 4 个保守的疏水性跨膜结构域;N-端结

构域中还包含与配体结合相关的 3 个环状结构 (Loop A – C)、以二硫键相连的两个半胱氨酸,其间有 13 个氨基酸残基构成的半胱氨酸环 (Cys-loop);nAChR α 亚基特有的位于 Loop C 中的两个相邻的半胱氨酸。此外,对 *Bdα9* 蛋白质序列进行预测,表明其存在 3 个潜在的 N-糖基化位点,分别为 N105、N192 和 N197。

2.2 *Bdα9* 的系统发育分析

将 *Bdα9* 基因推导的氨基酸序列与 GenBank 上已登录的其他昆虫(黑腹果蝇、西方蜜蜂、冈比亚按蚊和家蚕)的烟碱型乙酰胆碱受体氨基酸序列进行比对,并利用 MEGA 6.0 中的邻接法构建了系统发育树。结果表明,*Bdα9* 亚基与黑腹果蝇、冈比亚按

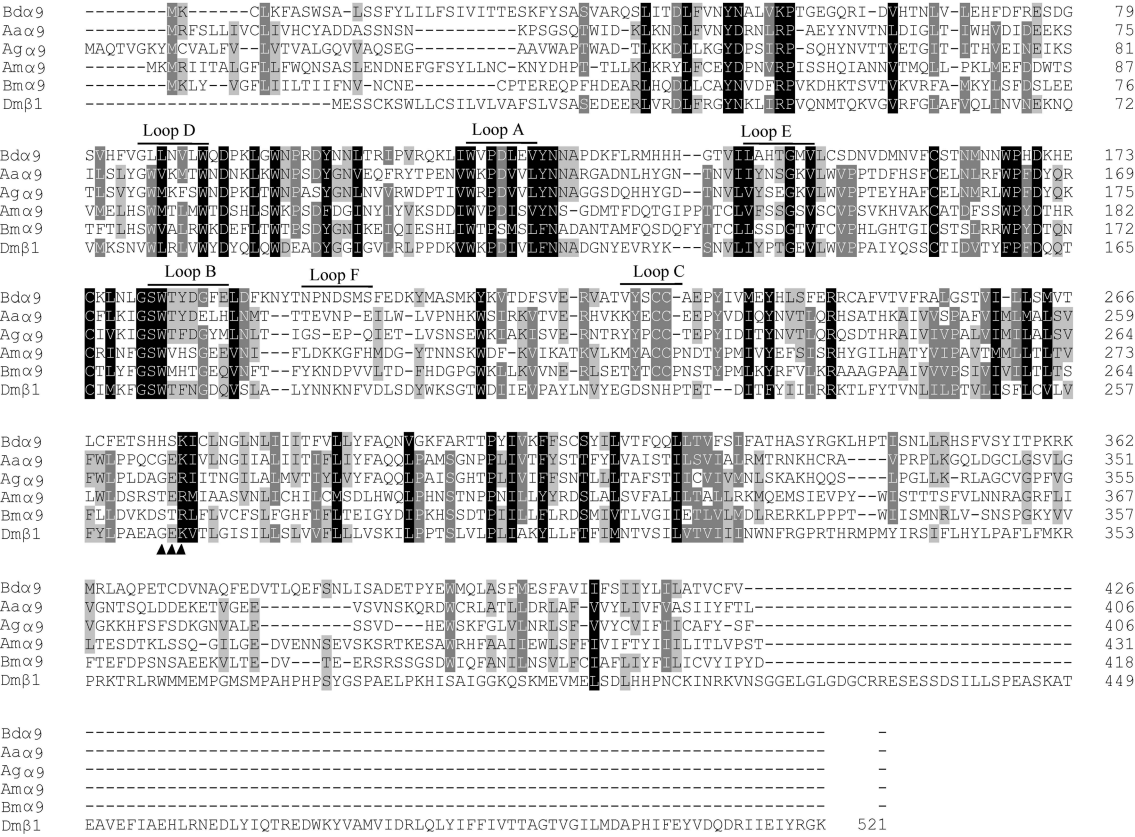


图2 橘小实蝇 *Bdaα9* 与其他昆虫烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 9$ 亚基氨基酸序列比较

Fig. 2 Amino acid sequence alignment among *Bdaα9* and nAChR $\alpha 9$ subunits from other insect species

烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 9$ 亚基来源及 GenBank 登录号 Origin of nAChR $\alpha 9$ subunits and their GenBank accession numbers; Aaα9: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (EAT41882); Agα9: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (AAU12513); Amα9: 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (AAY87896); Bmα9: 家蚕 *Bombyx mori* (ABV45523); Dmα9: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (CAA27641).

蚊的 $\alpha 9$ 亚基聚为一支 (图 3), 与黑腹果蝇 $\beta 3$ 亚基同源性最高, 但序列分析表明, *Bdaα9* 具有典型的烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基的特性 (图 1, 图 2)。

2.3 *Bdaα9* 在橘小实蝇不同发育阶段的表达模式

采用 qPCR 法, 对橘小实蝇不同发育时期的 mRNA 表达量进行了测定, 结果表明 *Bdaα9* 基因在卵、幼虫、蛹及成虫期均有表达, 其在卵、2 龄幼虫、3 龄幼虫及蛹中的表达没有显著差异, 但在成虫中的表达显著高于卵、2 龄幼虫、3 龄幼虫及蛹 (图 4: A)。 *Bdaα9* mRNA 在成虫、1 龄幼虫、蛹、卵及 2 龄幼虫中的表达量分别是 3 龄幼虫期的 9.0, 5.7, 3.3, 1.53 和 1.48 倍。

2.4 *Bdaα9* 在橘小实蝇成虫不同组织中的表达模式

对橘小实蝇成虫期不同组织中的 qPCR 检测结果表明, *Bdaα9* mRNA 在头部和胸部中的表达量显著高于腹部, 分别是腹部中的 68.07 和 15.57 倍 (图 4: B)。

3 讨论

昆虫 nAChR 作为杀虫剂的重要靶标之一, 在昆虫抗药性的形成中起着重要作用。研究表明, 多种昆虫在杀虫剂选择压力下通过乙酰胆碱受体基因的点突变、删除、截短等形式产生抗性 (Baxter *et al.*, 2010; Rinkevich *et al.*, 2010; Bass *et al.*, 2011)。同时, 基因的下调也参与了昆虫对杀虫剂的抗性。例如, 新烟碱类药剂抗性家蝇品系的 *Mda2* mRNA 的拷贝数要比敏感品系的低 60%, 推测这可能是其产生抗性的原因之一 (Markussen and Kristensen, 2010); 通过 RNAi 抑制褐飞虱 nAChR $\alpha 8$ 亚基的表达后, 褐飞虱对吡虫啉的敏感性降低 (Zhang *et al.*, 2015), 同样, 抑制马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* nAChR $\alpha 1$ 亚基基因 (*Lda1*) 的表达后其对吡虫啉和噻虫嗪的敏感性也降低 (Qu *et al.*, 2016)。昆虫 nAChR 各亚基基因的克隆是研究昆虫抗药性机理的

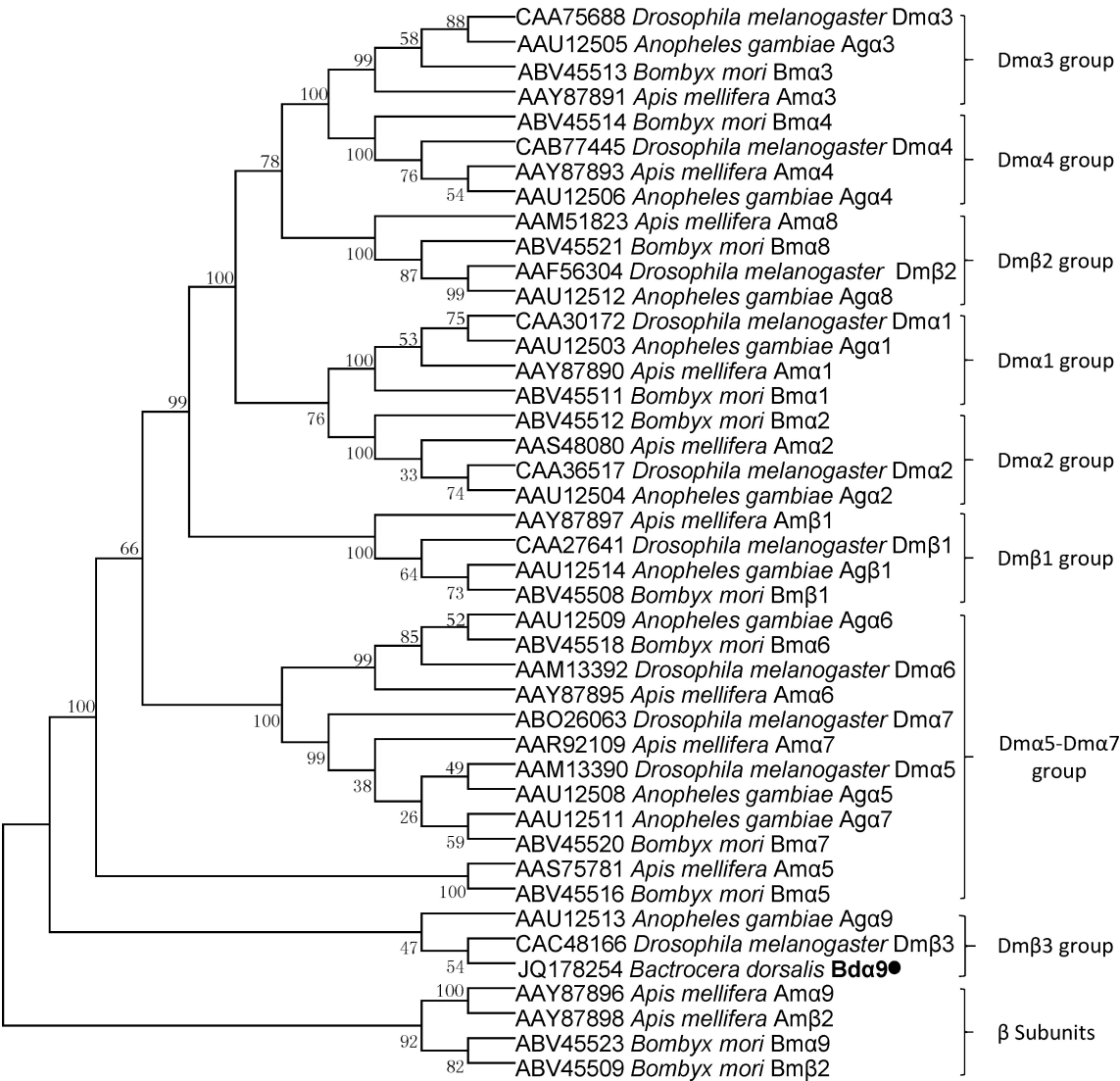


图 3 橘小实蝇 *Bda9* 与其他昆虫烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 9$ 亚基系统发育分析(邻接法)

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Bda9* with nAChR $\alpha 9$ subunits from other insects based on amino acid sequence (neighbor-joining method) 系统发育树用 MEGA 6.0 软件中的邻接法构建,各自分支上的数字为自引导值(1 000 次重复)。The phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0 with neighbor-joining method, and the bootstrap values were obtained from 1 000 replicates.

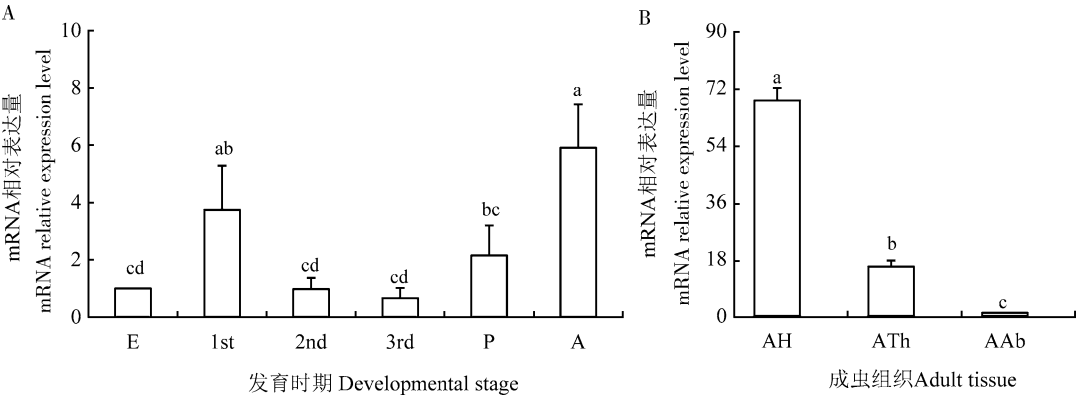


图 4 *Bda9* mRNA 在橘小实蝇不同发育时期(A)和成虫不同组织(B)中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *Bda9* mRNA in different developmental stages (A) and adult tissues (B) of *Bactrocera dorsalis* E: 卵 Egg; 1st: 1 龄幼虫 1st instar larva; 2nd: 2 龄幼虫 2nd instar larva; 3rd: 3 龄幼虫 3rd instar larva; P: 蛹 Pupa; A: 成虫 Adult; AH: 成虫头部 Adult head; ATh: 成虫胸部 Adult thorax; AAb: 成虫腹部 Adult abdomen. 图中数据为平均值 $\pm$ 标准误;柱上不同字母代表组间差异显著 (Duncan 氏多重比较检验, $P < 0.05$)。Data are mean $\pm$ SE. Different letters above bars indicate significant difference between groups (Duncan's multiple comparison test, $P < 0.05$).

前提。先前报道中,仅对橘小实蝇 nAChR *Bda*6 和 *Bd*3 的克隆进行了研究(Yang *et al.*, 2012; 杨文佳等, 2012),而其他在橘小实蝇抗药性形成中可能起着重要作用的亚基仍未见报道。因此,克隆橘小实蝇 *Bda*9 为进一步研究其在药剂敏感性中的作用奠定了基础。

对获得的橘小实蝇 *Bda*9 cDNA 全长序列的同源性分析结果表明,虽然其与黑腹果蝇 *Dm*3 的亲缘关系更近,但 *Bda*9 的编码蛋白具有 nAChR α 亚基的典型特征,因此,即使 *Bda*9 与黑腹果蝇 *Dm*3 氨基酸序列一致性最高,但仍可确定为 α 亚基。类似的情况在其他昆虫中也有报道,如冈比亚按蚊 *Agam*9 为果蝇非 α 亚基 *D*3 的直系同源基因(Jones *et al.*, 2005)。对橘小实蝇 *Bda*9 氨基酸多重比对时发现第 2 跨膜区(TM2)上游处缺少 GEK 基序,而这一基序被证实可能与离子的渗透和离子的选择有关(Jensen *et al.*, 2005)。在二化螟 *Chilo suppressalis* nAChR *Csa*9、蜜蜂 nAChR *Am*9 及家蚕 nAChR *Bm*9 中也发现有相同的情况(Jones *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2016)。

不同种昆虫之间或昆虫与脊椎动物之间 nAChR α 亚基的氨基酸序列相似性均比较低,如从冈比亚按蚊基因组中鉴定出的 10 个 nAChR 亚基中,除 *Agam*9 亚基外,其他亚基与果蝇或脊椎动物相应 nAChR 亚基均有较高的相似性,*Agam*9 亚基与其他昆虫的 nAChR 亚基相似性较低,而与脊椎动物所有 nAChR 亚基大约只有 20% 的核苷酸序列一致性(Jones *et al.*, 2005);马铃薯甲虫 nAChR α 亚基(*Lda*9)与赤拟谷盗 nAChR α 亚基氨基酸序列一致性最高,达 47%,与家蚕 nAChR α 亚基的氨基酸序列一致性为 32%(李晨歌等, 2014)。在 nAChR β 亚基中也发现有这种现象,如二化螟的 *Cs*2 和 *Cs*3 与同目昆虫家蚕的直系同源基因编码蛋白氨基酸序列一致性分别为 29% 和 33%(Xu *et al.*, 2016)。本研究发现,橘小实蝇 *Bda*9 与其他昆虫 α 亚基的氨基酸序列一致性均较低,仅在 20% 左右。以上研究结果表明这些亚基在不同种之间保守性较差。因此,可以推想这些亚基可能在不同昆虫中发挥着不同的作用,为此可利用这一特性来开发具有种选择性的杀虫剂。

研究发现 nAChR 基因在昆虫不同发育阶段的表达存在一定的差异。如二化螟的 *Csa*9 在其卵期表达量最高,1-5 龄幼虫发育过程中表达量持续降低,从蛹期到成虫期又逐渐升高(Xu *et al.*, 2016)。

而马铃薯甲虫 *Lda*9 则在蛹期表达量最高(李晨歌等, 2014)。本研究发现橘小实蝇 *Bda*9 在不同发育阶段均有表达,成虫期的表达量显著高于卵、2 龄幼虫、3 龄幼虫及蛹期,在 3 龄幼虫期表达量最低,这可能与该亚基在成虫期发挥重要作用相关,其具体的功能还有待于进一步的研究。由此可见,nAChR α 亚基基因不仅在不同昆虫的不同发育阶段表达模式存在差异,而且在同种昆虫的不同发育阶段的表达谱也存在显著差异。

nAChR α 亚基基因在同种昆虫不同组织中的表达也存在差异。如马铃薯甲虫 *Lda*9 在成虫头部及胸部中的表达水平较高,腹部中的表达量最低(Qu *et al.*, 2016);而苹果蠹蛾 *Cpa*9 在幼虫和蛹的头部及体躯中均有表达(Martin and Garczynski, 2016)。本研究发现,*Bda*9 在橘小实蝇成虫头部和胸部中的表达量显著高于腹部,头部中的表达量最高,腹部中的表达量最低。上述研究均显示 nAChR α 亚基基因在头部高表达,可能与 nAChR 在中枢神经系统起重要作用相关。但也有不同的报道,如二化螟的 *Csa*9 在脂肪体中的表达量最高,而在中枢神经系统中的表达量最低(Xu *et al.*, 2016);对于苹果蠹蛾,仅在其成虫的体躯中检测到了 *Cpa*9 的表达,而在成虫的头部并没有检测到(Martin and Garczynski, 2016)。对于昆虫 nAChR α 亚基基因表达模式的多样性还需要进一步的研究。

以往对昆虫 nAChR 多个亚基的功能研究,大多集中在由靶标位点变化导致的杀虫剂结合能力的降低上。最近关于 nAChR 不同亚基基因表达量变化与昆虫抗药性的关系日益受到关注(Rinkevich and Scott, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2016)。随着基因沉默及基因编辑技术的发展,针对不同昆虫中 nAChR α 亚基氨基酸相似度低、表达情况复杂等情况,可进一步借助 RNAi 和 CRISPR/Cas9 等技术研究明确其功能,为将来选择性杀虫剂的开发和研制提供理论基础,同时为害虫的田间抗性治理提供参考。

参考文献 (References)

- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul V, Crossthwaite AJ, Denholm I, Field LM, Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R, 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci.*, 12(1): 1-11.
- Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao JZ, Vogel H, Shelton AM,

- Heckel DG, Jiggins CD, 2010. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genet.*, 6(1): e1000802.
- Follett PA, Neven LG, 2006. Current trends in quarantine entomology. *Annu. Rev. Entomol.*, 51(1): 359–385.
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG, 2007. The nicotinic acetylcholine receptor subunits M $\alpha 5$ and M $\beta 3$ on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance. *Insect Mol. Biol.*, 16(6): 691–701.
- Grutter T, de Carvalho LP, Dufresne V, Taly A, Edelstein SJ, Changeux JP, 2005. Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(50): 18207–18212.
- Hou W, Liu Q, Tian L, Wu Q, Zhang Y, Xie W, Wang S, Miguel KS, Funderburk J, Scott JG, 2014. The $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunit of *Frankliniella occidentalis* is not involved in resistance to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 111: 60–67.
- Hsu JC, Feng HT, Wu WJ, Geib SM, Mao CH, Vontas J, 2012. Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene B $\alpha 6$ are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(10): 806–815.
- Hsu JC, Huang LH, Feng HT, Su WY, 2015. Do organophosphate-based traps reduce control efficiency of resistant tephritid flies? *J. Pest Sci.*, 88(1): 181–190.
- Jensen ML, Schousboe A, Ahring PK, 2005. Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J. Neurochem.*, 92(2): 217–225.
- Jin T, Zeng L, Lin YY, Lu YY, Liang GW, 2011. Insecticide resistance of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), in mainland China. *Pest Manag. Sci.*, 67(3): 370–376.
- Jones AK, Bera AN, Lees K, Sattelle DB, 2010. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity*, 104(3): 247–259.
- Jones AK, Grauso M, Sattelle DB, 2005. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics*, 85(2): 176–187.
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB, 2006. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res.*, 16(11): 1422–1430.
- Jones AK, Sattelle DB, 2007. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 8(1): 1–16.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA, 2004. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.*, 27(6): 329–336.
- Li CG, Qu Y, Han ZJ, Jiang WH, 2014. Cloning and expression analysis of three genes encoding nicotinic acetylcholine receptor α subunit in *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 37(3): 65–71. [李晨歌, 琚阳, 韩召军, 姜卫华, 2014. 马铃薯甲虫 3 个烟碱型乙酰胆碱受体 α 亚基基因的克隆及表达分析. 南京农业大学学报, 37(3): 65–71]
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS, Casida JE, 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(24): 8420–8425.
- Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Han ZJ, Denholm I, Millar NS, 2006. A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *J. Neurochem.*, 99(4): 1273–1281.
- Markussen MDK, Kristensen M, 2010. Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit M $\alpha 2$ in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L. *Pest Manag. Sci.*, 66(11): 1257–1262.
- Martin JA, Garczynski SF, 2016. Putative nicotinic acetylcholine receptor subunits express differentially through the life cycle of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Sci.*, 23(2): 277–287.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22(11): 573–580.
- Perry T, McKenzie JA, Batterham P, 2007. A knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(2): 184–188.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): e45.
- Puinean AM, Lansdell SJ, Collins T, Bielza P, Millar NS, 2013. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J. Neurochem.*, 124(5): 590–601.
- Qu Y, Chen J, Li C, Wang Q, Guo W, Han Z, Jiang W, 2016. The subunit gene *L $\alpha 1$* of nicotinic acetylcholine receptors plays important roles in the toxicity of imidacloprid and thiamethoxam against *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 127: 51–58.
- Rinkevich FD, Chen M, Shelton AM, Scott JG, 2010. Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *Pxyl $\alpha 6$* with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Invert. Neurosci.*, 10(1): 25–33.
- Rinkevich FD, Scott JG, 2013. Limitations of RNAi of $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunits for assessing the *in vivo* sensitivity to spinosad. *Insect Sci.*, 20(1): 101–108.
- Shao YM, Dong K, Zhang CX, 2007. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 8: 324–333.
- Shen GM, Jiang HB, Wang XN, Wang JJ, 2010. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *BMC Mol. Biol.*, 11(1): 1–10.
- Shi XG, Zhu YK, Xia XM, Qiao K, Wang HY, Wang KY, 2012. The mutation in nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit may confer resistance to imidacloprid in *Aphis gossypii* (Glover). *J. Food*,

Agric. Environ., 10(2): 1227–1230.

Xu G, Wu SF, Teng ZW, Yao HW, Fang Q, Huang J, Ye GY, 2016. Molecular characterization and expression profiles of nicotinic acetylcholine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Sci.*, 23 (2): 277–287.

Yang WJ, Cong L, Xie YF, Chen L, Dou W, Wang JJ, 2012. Cloning and mRNA expression analysis of the nicotinic acetylcholine receptor β subunit in *Bactrocera dorsalis*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(2): 335–341. [杨文佳, 丛林, 谢逸菲, 陈力, 豆威, 王进军, 2012. 桔小实蝇烟碱型乙酰胆碱受体 β 亚基基因的克隆及 mRNA 表达分析. *应用昆虫学报*, 49(2): 335–341]

Yang WJ, Tian Y, Cong L, Dou W, Wang JJ, 2012. cDNA cloning and expression analysis of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.*, 95(2): 253–260.

Zhang YP, Zeng L, Lu YY, Liang GW, 2007. Monitoring of insecticide resistance of *Bactrocera dorsalis* adults in south China. *J. South China Agric. Univ.*, 28(3): 20–23. [章玉苹, 曾玲, 陆永跃, 梁广文, 2007. 华南地区桔小实蝇抗药性动态监测. *华南农业大学学报*, 28(3): 20–23]

Zhang YX, Wang X, Yang BJ, Hu YY, Huang LX, Bass C, Liu ZW, 2015. Reduction in mRNA and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 8$ subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Neurochem.*, 135(4): 686–694.

(责任编辑: 袁德成)